

牡蛎壳纳米羟基磷灰石的制备与表征

蔡汝汝¹, 杨 云¹, 孙珍珍¹, 姚清清¹, 侯振清¹, 张其清^{1,2,3*}

(1. 厦门大学 材料学院, 福建省生物医学工程重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 中国医学科学院, 北京协和医学院, 北京 100730; 3. 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192)

摘要: 以僧帽牡蛎壳粉末为原料, 通过水热反应合成纳米羟基磷灰石(rHA), 考察反应时间、反应温度、反应物摩尔比及牡蛎壳粉末的微结构对反应的影响。运用 X 射线衍射(XRD)、扫描电子显微镜(SEM)、红外光谱(FTIR)、X 射线能谱仪(EDS)及 MTT 实验表征产物的晶相组成、形貌、化学组成及细胞相容性。结果显示, 牡蛎壳粉末经水热反应后仍保持其原有形貌, 产物为部分 CO_3^{2-} 取代的片状 rHA , 其 Ca/P 摩尔比约为 1.5, 其结构及组成与人骨 HA 相似, 细胞相容性良好。牡蛎壳粉末外表面方解石通过溶解重结晶过程转化为片状 rHA , 内部方解石则经由固态局部规整离子交换反应转化为 rHA 。最佳水热反应条件为 $220\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 6 h, 牡蛎壳中 Ca 与 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 中 P 摩尔比为 5 : 6。

关键词: 牡蛎壳; 纳米羟基磷灰石; 水热反应; 反应机理; 生物相容性

中图分类号: R 318

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)05-0666-05

羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)具有良好的生物相容性和骨传导性, 是理想的硬组织替代材料^[2]。随着海洋资源的开发与应用, 生物质 CaCO_3 转化 HA 成为新的研究热点。然而文献报道多以珊瑚、乌贼骨等作为原料, 其资源稀缺且获取成本高。因此, 寻求一种资源丰富的生物材料合成 HA 具有重要实际意义。汪港等^[3]以牡蛎壳白垩层为原料, 常压水浴加热合成 HA。Lemos 等^[4]考察了紫贻贝粉末和牡蛎壳粉末在不同水热条件下合成 HA 的动力学过程。Lamghari 等^[5]报道贝壳类生物材料具有良好的生物相容性, 可促进骨细胞的增殖与分化。Göller 等^[6]发现牡蛎壳本身含有的微量元素在水热转化后保留在生成的 HA 中, 与人骨更相似。因此, 利用废弃牡蛎壳开发生物材料不仅可解决海域污染问题, 而且具有巨大的潜在经济效益。牡蛎壳种类丰富且成分多变, 目前对于贝壳类水热转化的研究大部分局限于文石水热转化^[4,7], 本文以福建省厦门海域僧帽牡蛎壳粉末为原料, 主要研究方解石型牡蛎壳粉末转化为纳米 HA(rHA)的水热条件及转化机理, 并对其生物相容性进行探讨。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牡蛎壳(僧帽牡蛎, 取自福建厦门); $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 CaCO_3 均为分析纯; XFB 400 粉碎机(中国吉首市中诚制药机械厂); 水热合成反应釜(河南省巩义市予华仪器有限责任公司); 扫描电子显微镜(LEO 1530, 德国 LEO 公司); X 射线衍射分析仪(X'Pert PRO, 荷兰帕纳科公司); 傅里叶变换红外光谱分析仪(Nicolet 380, 美国热电公司)。

1.2 实验过程

1.2.1 HA 的制备

取新鲜牡蛎壳去除残留软组织, 物理清洗后自然风干, 5% (质量分数) NaClO 中浸泡 1 d 并用去离子水反复冲洗 3 次后自然风干。将牡蛎壳粉碎后过 200 目筛。取牡蛎壳粉末与相应质量的 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 放入到反应釜内胆(容量为 100 mL, 聚四氟乙烯制作), 加入 50 mL 去离子水, 置于磁力搅拌器上搅拌 30 min 后密封于反应釜中。按表 1 中所列条件进行反应, 反应结束后, 待反应釜冷却至室温, 取出产物依次用去离子水、无水乙醇离心洗涤, $80\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干。另用同样方法以 CaCO_3 为原料, 制备 HA。

1.2.2 测试和表征

采用 X 射线衍射分析仪对样品的物相进行鉴定;

收稿日期: 2010-03-31

基金项目: “十一·五”国家科技支撑计划重点项目(2007BAD07B05); 福建省海洋与渔业局重点项目(闽海渔合同号[2008]1-11)

* 通讯作者: zhangqiq@xmu.edu.cn

表 1 样品的制备条件

Tab. 1 Preparation conditions of the samples

Ca ²⁺ 来源	t/ °C	t/h	n(CaCO ₃) : n((NH ₄) ₂ HPO ₄)
牡蛎壳粉末/ CaCO ₃	120	6	5: 3, 5: 6, 5: 9
牡蛎壳粉末/ CaCO ₃	140	6	5: 3, 5: 6, 5: 9
牡蛎壳粉末/ CaCO ₃	180	2, 6, 24, 30	5: 3, 5: 6, 5: 9
牡蛎壳粉末/ CaCO ₃	220	6	5: 3, 5: 6, 5: 9

注: 牡蛎壳中 CaCO₃ 质量分数约为 96% 以上^[4], 假设加入的牡蛎壳中全部为 CaCO₃.

采用傅里叶变换红外光谱分析仪对样品的成分进行分析; 采用扫描电子显微镜对样品的形貌和尺寸进行观察; 采用 X 射线能谱仪(EDS) 测定样品 Ca/P 摩尔比; 利用 MTT 实验检测细胞相容性.

2 结果与讨论

2.1 XRD 分析

图 1 是水热处理前(原始牡蛎壳粉末) 及不同水热条件下样品粉末 XRD 图谱. 图 1a 各衍射峰与 JCPDS # 85-1108 一致, 表明僧帽牡蛎壳中矿物成分单一为方解石型 CaCO₃. 牡蛎壳粉末与磷酸盐的 Ca/P 摩尔比为 5: 3 时分别在 120, 140, 180 和 220 °C 下水热反应 6 h 后所得产物 XRD 图谱如图 1b, c, d, g 所示. 结果显示, 当温度为 120 °C 时, HA 的各主强峰均已出现, 与标准卡片 JCPDS# 86-0740 对应较好, 可见明显方解石残余(2θ= 29.5°). 随温度升高, HA 三强峰强度逐渐增强, 说明 HA 结晶程度随水热温度提高而逐渐趋于完善. 水热温度在 220 °C 时, HA 特征峰峰型尖锐清晰, 结晶度较高. 方解石特征峰强度随反应温度升高逐渐减弱, 在 220 °C 时仅有少量残余, 表明温度升高可促进牡蛎壳粉末向 HA 转化. 增加磷酸盐浓度使 Ca/P 摩尔比为 5: 6 可促进牡蛎壳粉末向 HA 转化. 水热温度为 180 °C 时, 有少量方解石残余, 当温度升至 220 °C 时, 牡蛎壳粉末可完全转化为结晶度较高的 HA 晶体(图 1h), 将其于 900 °C 煅烧 3 h, 其 HA 衍射峰峰形狭窄尖锐对称, 出现 β-磷酸三钙(β-TCP) 衍射峰(图 1i). 当 Ca/P 摩尔比为 5: 3, 反应温度为 180 °C 时, 水热反应 2 h 后 HA 各主强峰均已出现. 衍射峰强度随反应时间延长而逐渐增强, 说明 HA 结晶度随水热时间延长逐渐趋于完善. 方解石特征峰逐渐减弱, 反应至 24 h 时仅为较弱的小峰, 延长反应时间至 30 h 无明显变化(XRD 数据未给出). 在相同反应条件下(180 °C, 6 h, Ca/P 摩尔比为 5: 6) 经水热处理后, CaCO₃ 可完全转化为 HA(图



图 1 牡蛎壳粉末及其在不同条件下产物的 XRD 图谱
a. 牡蛎壳粉末; b. 牡蛎壳粉末 120 °C; c. 牡蛎壳粉末 140 °C; d. 牡蛎壳粉末 180 °C; e. 牡蛎壳粉末 180 °C; f. CaCO₃ 180 °C; g. 牡蛎壳粉末 220 °C; h. 牡蛎壳粉末 220 °C; i. h 在 900 °C 煅烧 3 h. b, c, d, g 的 Ca/P 摩尔比为 5: 3, 反应 6 h; e, f, h 的 Ca/P 摩尔比为 5: 6, 反应 6 h

Fig. 1 XRD patterns of oyster shell and samples under different conditions

1f), 而牡蛎壳粉末有部分方解石残留, 且生成了少量 β-TCP(图 1e).

2.2 HA 的 FTIR 分析

如图 2a 所示, 原始牡蛎壳粉末 FTIR 图谱与方解石矿物完全相同, 可见 CO₃²⁻ 的 3 个特征吸收峰(ν 为 879 cm⁻¹; ν 为 1 417.3 cm⁻¹; ν 为 713 cm⁻¹). 经水热反应后, 所制备的 HA 晶体 FTIR 图谱如图 2b 所示. 564, 601 cm⁻¹; 962 cm⁻¹; 1 041, 1 093 cm⁻¹ 分别归属于 PO₄³⁻ 的 ν, ν, ν 振动吸收峰, 628 和 3 570 cm⁻¹ 归属于 HA 中 -OH 的扭转和伸缩振动吸收峰, 为

HA 典型特征峰。PO₄³⁻ 的 ν 振动吸收峰的分化程度高说明, 制得 HA 结晶度较高, 与 XRD 分析所得出的结论一致. 随着反应时间的延长, CO₃²⁻ 的吸收峰逐渐减弱, 有的消失, 而 PO₄³⁻ 的吸收峰逐渐变强变锐, 说明 CO₃²⁻ 逐渐被 PO₄³⁻ 置换. 在图 2b 中可见 CO₃²⁻ 的 ν 消失而 ν 及 ν 直至反应最后仍然保留部分, 这即是因为存在 A 型、B 型两种取代^[8]. 在图 2b 中可见 CO₃²⁻ 的 ν 分裂为 2 个吸收峰 1 420 和 1 454 cm⁻¹, 它区别于碳酸盐中的单峰, 是 CO₃²⁻ 进入磷灰石结构的重要标志^[9]. 在人体骨磷灰石中也有 CO₃²⁻ 的存在, 人体中 CO₃²⁻ 含量为 2.3% ~ 8% (质量分数), 具体含量多少取决于个体的年龄, 说明水热反应制备的牡蛎壳 HA 与人骨组分非常相似.

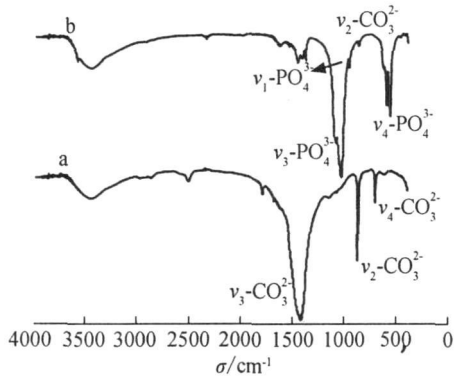


图 2 牡蛎壳粉末及其水热反应后的 FTIR 图谱
a. 牡蛎壳粉末; b. 牡蛎壳粉末 220 °C, Ca/P 摩尔比为 5: 6 条件下合成产物
Fig. 2 FTIR spectra of oyster shell powder (a) and samples (b)

2.3 HA 的 SEM 及 EDS 分析

由牡蛎壳断面 SEM 图(图 3a)可见, 牡蛎壳为整齐排列的层状结构, 每层之间存在大量孔隙, 这种特殊结构使其具有硬度高、抗断裂能力强的特征. 将其粉碎过筛后可见断裂的块状结构, 内有大量孔隙, 孔径约为 2~ 10 μ m(图 3b). 牡蛎壳粉末于 140 °C 水热反应 6 h 后基本保留牡蛎壳粉末的微结构, 表面生成片状 α -HA 结晶体, 尺寸约为 100~ 250 nm(图 3d). 随着反应温度升高, 片状 α -HA 晶体相互簇拥, 聚集成花瓣状团簇(图 3e). 较高的反应温度为 α -HA 沉积物小颗粒提供了一个高活性的表面, 小颗粒通过这种表面彼此相结合, 从而聚集成花瓣状团簇. 随着反应时间的延长或反应温度的升高, 部分片状晶体逐渐变为短柱状或六方柱状, 可见在片状颗粒中间簇生出一些宽约 50 nm、长约 150 nm 的六方柱体(图 3f). 在尺寸上与自然

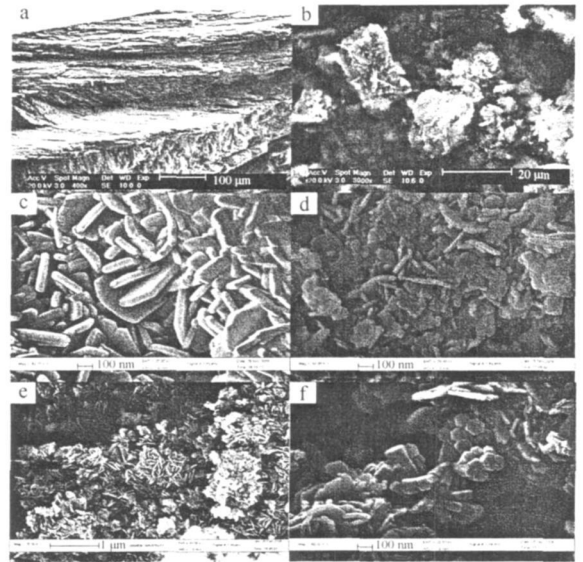


图 3 牡蛎壳粉末, CaCO₃ 及不同条件下水热反应产物的 SEM 照片
a. 牡蛎壳断面; b. 牡蛎壳粉末; c. CaCO₃ 140 °C 6 h; d. 牡蛎壳粉末 140 °C 6 h; e. 牡蛎壳粉末 220 °C 6 h; f. 牡蛎壳粉末 180 °C 24 h. c~ f 的 Ca/P 摩尔比均为 5: 3
Fig. 3 SEM photos of oyster shell powder and its samples under different conditions and CaCO₃

人骨 HA 晶体接近. 图 3e 样品的 EDS 元素分析结果显示, 样品中钙磷元素的质量分数分别为 38.14% 和 19.51%, 样品 Ca/P 摩尔比为 1.5 小于理论化学计量比 1.67. 在水热反应体系中, PO₄³⁻ 浓度较大, Ca²⁺ 浓度相对较小, α -HA 晶体在成核和晶体生长过程中出现钙缺位从而形成缺钙型 α -HA, 导致产物 Ca/P 摩尔比低, 在组成上与人骨 HA 更相似^[10].

2.4 生物相容性检测

采用 MTT 检测评价水热转化(220 °C, Ca/P 摩尔比为 5: 6, 6 h)所制备的 α -HA 的细胞相容性及细胞在材料表面的存活和增殖情况. 在活细胞线粒体中, MTT 试剂被还原成蓝色的甲瓩, 甲瓩生成量与活细胞数量成正比. 用酶联免疫检测仪测定其吸光度(OD), 从而得到细胞生长情况. 小鼠原成骨细胞 MC3T3-E1 与 α -HA 在体外培养细胞生长情况检测结果如图 4 所示, 可见细胞数量随着时间的延长而增加, 细胞相对生长率(RGR)计算公式为:

$$RGR = (OD_E / OD_C) \times 100\%$$

其中 OD_E 和 OD_C 分别是实验组和阴性对照组吸光度平均值. 同时根据中国国家标准 GB/T 16686—1997 材料毒性评分标准列出细胞毒性分级(CTG)(表

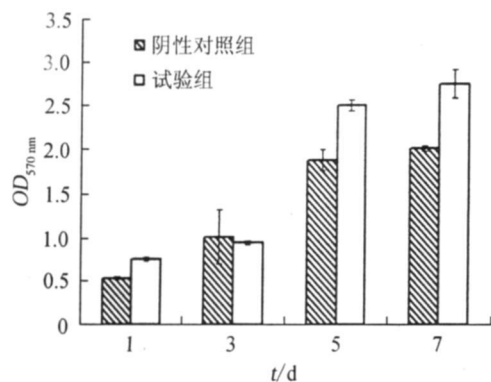


图 4 小鼠原成骨细胞与 rHA 体外培养不同时间段 MTT 检测结果

Fig. 4 MTT assay for proliferation of osteoblasts cultured with rHA

表 2 成骨细胞与 rHA 体外培养细胞的 RGR 和材料的 CTG

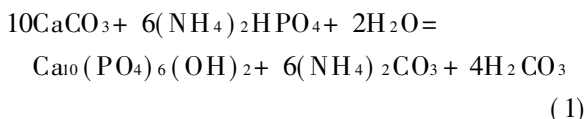
Tab. 2 RGR of MC3T3-E1 osteoblasts and CTG of rHA cultured in vitro

t/d	RGR/%	CTG
1	141.5	0
3	92.3	1
5	133.7	0
7	136.6	0

2), 结果表明, 材料无细胞毒性(0 级和 1 级均为无毒性), 随时间增加细胞的相对生长率明显升高, 呈现出良好的细胞相容性。

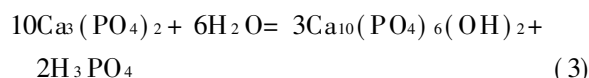
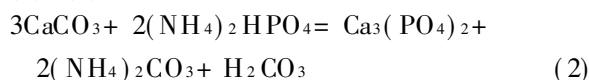
2.5 HA 转化机理讨论

本实验所采用的僧帽牡蛎经检测为单一方解石晶体。方解石与磷酸盐溶液经水热反应转变成 rHA, 一般是通过表面的溶解-重结晶(dissolution-recrystallization)和内部的固态局域规整离子交换反应(solid-state topotactic ion exchange reaction)这两种方式来完成^[11-12]。纯 CaCO₃ 和牡蛎壳粉末在水热反应中, 其表面方解石释放出 Ca²⁺ 与磷酸盐溶液中的 PO₄³⁻ 和 OH⁻ 直接反应生成 rHA, 其反应式如式(1)所示。



由于 rHA 的溶解度(69.6×10^{-126})^[13] 远远小于 CaCO₃ 的溶解度(4.5×10^{-9})^[14], 所以 rHA 容易在方解石表面结晶生长。水热反应过程中, 方解石表面由溶解-重结晶形成的片状 rHA 晶体, 随着时间的延长逐步长大, 遵守晶体生长的基本理论之一晶体的阶梯

状生长, 在片状颗粒上逐步簇生出六方柱。另外, 牡蛎壳粉末在水热反应中, 由于粉末尺寸较大, 内部方解石不能与磷酸盐直接接触, 而是溶液中的 PO₄³⁻ 进入到方解石内部与 CO₃²⁻ 进行离子交换生成 β-TCP, 由于两者结构相似, 反应时不改变原来方解石的形貌及规则排列方式, 在它们之间只进行离子交换, 直至最终产物 rHA 形成都不需经过成核再结晶, 因此, 水热反应所得产物与其原始结构仍然相似。由于 β-TCP 不是热力学最稳定状态, 随温度升高进一步向热力学最稳定的 rHA 转化, 最终全部转化为 rHA 晶体, 其反应式如式(2), (3)所示。



3 结 论

在僧帽牡蛎壳粉末水热反应中, 提高反应温度、延长反应时间、增加磷酸盐浓度均可促进牡蛎壳粉末向 rHA 方向转化, 所制备的 rHA 结晶度高, 为纳米级片状晶体, 聚集成花瓣状团簇, 随着反应时间的延长可见有六方柱状 rHA 生成。牡蛎壳粉末外表面方解石通过溶解-重结晶过程转化为片状 rHA, 内部方解石则经由固态局域规整离子交换反应转化为 rHA。水热合成的适宜 Ca/P 摩尔比为 5:6, 温度为 220 °C, 时间为 6 h。采用方解石型牡蛎壳通过水热反应可得到 CO₃²⁻ 取代的缺钙型 rHA, 其晶粒尺寸和组分均与人骨类似, 体外细胞毒性实验显示材料具有良好的生物相容性, 更有利于作为生物医用骨修复材料应用。

参考文献:

- [1] Sepulveda P, Bressiani A H, Bressiani J C, et al. In vivo evaluation of hydroxyapatite foams [J]. Biomed Mater Res, 2002, 62(4): 587-592.
- [2] Lee J J, Rouhfar L, Beirne O R. Survival of hydroxyapatite coated implants: a meta-analytic review [J]. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2000, 58(12): 1372-1379.
- [3] 汪港, 张伟刚, 张刚生, 等. 天然多孔材料水热合成羟基磷灰石 [J]. 功能材料, 2008, 39(12): 2038-2041.
- [4] Lemos A F, Rocha J H G, Ferreira J M F, et al. Hydroxyapatite nano-powders produced hydrothermally from nacreous material [J]. Journal of the European Ceramic Society, 2006, 26(16): 3639-3646.
- [5] Lamghari M, Almeida M J, Lopez E, et al. Stimulation of

- bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies[J]. *Bone*, 1999, 25(2): 91S-94S.
- [6] Göller G, Oktar F N, Agathopoulos S, et al. The influence of sintering temperature on mechanical and microstructural properties of bovine hydroxyapatite[J]. *Key Engineering Materials*, 2005, 284/285/286: 325-328.
- [7] Vecchio K S, Zhang X, Massie J B, et al. Conversion of bulk seashells to biocompatible hydroxyapatite for bone implant[J]. *Acta Biomaterials*, 2007, 3(6): 910-918.
- [8] Landi E, Celotti G, Logroscino G, et al. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute[J]. *Journal of the European Ceramic Society*, 2003, 23(15): 2931-2937.
- [9] 董利民, 王晨, 田杰谟, 等. 类骨磷灰石的结构分析与形成机制研究[J]. *功能材料*, 2004, 35(21): 2397-2400.
- [10] 张阳德, 乐园, 赵梓屹. 羟基磷灰石骨修复材料[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(1): 72-75.
- [11] Yoshimura M, Sujaridworakun P, Koh F, et al. Hydrothermal conversion of calcite crystals to hydroxyapatite[J]. *Materials Science and Engineering C*, 2004, 24(4): 521-525.
- [12] Eysel W, Roy D M. Topotactic reactions of aragonite to hydroxyapatite[J]. *Zeitschrift für Kristallographie*, 1975, 141: S11-S24.
- [13] Elliott J C. Structure and chemistry of the apatites and other orthophosphates[M]. Amsterdam: Elsevier, 1994: 6.
- [14] Perry D L, Ohillips S L. Handbook of inorganic compounds[M]. Boca Raton FL: CRC Press, 1995.

Preparation and Characterization of Nano-hydroxyapatite from Oyster Shell

CAI Ru-ru¹, YANG Yun¹, SUN Zhen-zhen¹, YAO Qing-qing¹,
HOU Zhen-qing¹, ZHANG Qi-qing^{1, 2, 3*}

(1. Key Laboratory of Biomedical Engineering of Fujian Province, College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Biomedical Materials, Tianjin 300192, China)

Abstract: Nano-hydroxyapatite (nHA) from *Ostrea cucullata* Born was obtained by hydrothermal synthesis method. The influence of reaction time, temperature, molar ratio of reactants and microstructure of oyster shell powder on the reaction was investigated. X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), energy dispersive spectroscopy (EDS) and MTT were employed to characterize the products. The results indicated that sheet structure of carbonated nHA were successfully produced via hydrothermal transformation. nHA retained the morphology of the original calcite. The molar ratio of Ca/P was about 1.5. The structure and component were much more similar to bone HA with good cell compatibility. The exterior calcite converts to nHA via dissolution-recrystallization. The interior calcite converts to nHA by a solid-state topotactic ion-exchange reaction. The best hydrothermal transformation condition is reacting at 200 °C for 6 h, the molar ratio of Ca in oyster shell to P in (NH₄)₂HPO₄ is 5:6.

Key words: oyster shell; nano-hydroxyapatite; hydrothermal conversion; reaction mechanism; biocompatibility